



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PRUEBAS DE COMPOSICIÓN PARA ESTABLECER
EL CONTROL DE CALIDAD DE LA PLANTA
MEDICINAL *Ligusticum porteri* COULTER & ROSE
(APIACEAE).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA:

KRUTZKAYA JUÁREZ REYES



MÉXICO, D.F.

AÑO: 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Rachel Mata Essayag
SECRETARIO: Isabel del Carmen Rivero Cruz
PRIMER SUPLENTE: Rogelio Gregorio Pereda Miranda
SEGUNDO SUPLENTE: Abraham Madariaga Mazón

Laboratorio 124, Dpto. Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR: M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

SUSTENTANTE: Krutzkaya Juárez Reyes

AGRADECIMIENTOS

- El presente proyecto de investigación se realizó gracias al apoyo económico de los proyectos DGAPA (PAPIIT IN-208907) a cargo de la Dra. Rachel Mata.
- Al CONACYT, por el apoyo otorgado a través de la beca del sistema nacional de investigadores (SNI).
- A los miembros del jurado asignado para la revisión de este proyecto de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.
- Al Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.
- De manera especial, quiero agradecer a la Q. Georgina Duarte Lisci, por su valioso apoyo durante la realización de los análisis de CG-EM y la búsqueda realizada en la base de datos para determinar la composición del aceite esencial.
- A la **Dra. Rachel Mata** por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación.
- Deseo expresar mi agradecimiento a mi asesora, la **M en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz** por el tiempo, paciencia, dedicación y ayuda brindadas para la realización de este trabajo de investigación, así como por su amistad.
- A la Dra. Araceli Pérez, por el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis.
- A mis amigos de la Facultad de Química.
- A mis amigos del Laboratorio 124, Guadalupe, Martha, Viridiana, Abraham, Fernando, Francisco, Gerardo, José Alberto, Martín y Sol por todo el conocimiento que me han transmitido y porque con ustedes el trabajo en el laboratorio en ningún momento es monótono.
- **A Clara, Noemí, Erick, Luis, Miguel y Ricardo por el tiempo que llevamos juntos, por la diversión y experiencias que hemos compartido y lo que aun nos falta por vivir. Gracias amigos.**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres José y Lorenza, a mi hermana Marlene, a mi abuela Ausencia, a mi tío Octaviano y a mi sobrina Johana, les agradezco todo el apoyo que me han brindado, ustedes son la parte fundamental de este logro.

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas	III
Lista de esquemas	VI
Lista de cuadros	VI
Lista de tablas	VI
Lista de figuras	VI
I. Antecedentes	1
1.1 Antecedentes de la especie <i>Ligusticum porteri</i> Coulter y Rose (Apiaceae)	1
1.1.1 Aspectos botánicos, químicos y farmacológicos de la especie <i>Ligusticum porteri</i>	1
1.2 El control de calidad de fitomedicamentos	5
II. Justificación y objetivos	9
III. Parte experimental	10
3.1 Material vegetal	10
3.2 Procedimientos generales de análisis	10
3.2.1 Análisis cromatográficos	10
3.3 Preparación del aceite esencial de <i>L. porteri</i>	11
3.4 Análisis de los componentes del aceite esencial de <i>L. porteri</i> (muestra C)	11
3.5 Aislamiento de la Z-ligustílida (1) y diligustílida (2) a partir de la fracción de hexano primaria de <i>L. porteri</i>	12
3.6 Determinación simultánea de la Z-ligustílida (1) y diligustílida (2) en la droga cruda de <i>L. porteri</i> por CLAE	14
3.6.1 Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico	15
3.6.1.1 Preparación de la matriz de trabajo	15
3.6.1.2 Adecuabilidad del sistema	15
3.6.1.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la Z-ligustílida (1)	15
3.6.1.4 Selectividad	15
3.6.1.5 Linealidad del sistema	16
3.6.1.6 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	16
3.6.1.7 Exactitud	16
3.6.1.8 Precisión	17

ÍNDICE -continuación-

	Página
3.7 Cuantificación de la Z-ligustílida (1) y diligustílida (2) presentes en las diferentes muestras de droga cruda y preparados herbolarios de <i>L. porteri</i>	17
IV. Resultados y discusión	18
4.1 Análisis del aceite esencial de <i>L. porteri</i> (muestra C) por CG-EM	18
4.2 Ensayos de composición para cuantificar a la Z-ligustílida (1) y diligustílida (2) presentes en <i>L. porteri</i> por CLAE	23
4.2.1 Validación del método	25
4.2.1.1. Selectividad	25
4.2.1.2 Linealidad del sistema	25
4.2.1.3 Linealidad del método y exactitud	28
4.2.1.4 Precisión del método y del sistema	29
4.2.1.5 Límites de detección y de cuantificación	31
4.2.1.6 Estabilidad	31
4.2.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios 1 y 2 presentes en los extractos orgánicos de <i>L. porteri</i>	31
V. Conclusiones	33
VI. Bibliografía	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	área bajo la curva
ACN	acetonitrilo
AcOH	ácido acético
ANADEVA	análisis de varianza
b_0	ordenada al origen
b_1	pendiente
°C	grados Celsius
CCA	cromatografía en columna abierta
CCF	cromatografía en capa fina
CCFP	cromatografía en capa fina preparativa
CG-EM	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CLAE	cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	centímetro
CMI	concentración mínima inhibitoria
CV	coeficiente de variación
CV _{y/x}	coeficiente de variación de la regresión lineal
di	diferencia absoluta de las medias aritméticas
DL ₅₀	dosis letal 50
eV	electronvolts
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	gramos
H ₂ O	agua
Hex	hexano
IC	intervalo de confianza
IC(β_0)	intervalo de confianza de la ordenada al origen para la media poblacional

LISTA DE ABREVIATURAS –continuación–

IC(β_1)	intervalo de confianza de la pendiente para la media poblacional
K'	factor de capacidad
Kg	kilogramo
λ	longitud de onda
LC	límite de cuantificación
LD	límite de detección
m	metros
MeOH	metanol
μg	microgramos
mg	miligramos
min	minuto
mL	mililitro
μL	microlitros
mm	milímetros
μm	micrómetros
μV	microvolts
nm	nanómetros
N	número de platos teóricos
NOM	Norma Oficial Mexicana
r	coeficiente de correlación
r^2	coeficiente de determinación
R	resolución
S	desviación estándar
$S_{y/x}$	desviación estándar de la regresión lineal
T	factor de coleo
t_R	tiempo de retención
uma	unidades de masa atómica
UV	ultravioleta

LISTA DE ABREVIATURAS –continuación–

OMS	Organización Mundial de la Salud
seg	segundo
\bar{y}	media aritmética

LISTA DE ESQUEMAS

		Página
Esquema 1	Aislamiento de la <i>Z</i> -ligustílida (1) y diligustílida (2) a partir del extracto orgánico de la corteza de <i>L. porteri</i>	13

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>L. porteri</i> por CG	20
Cuadro 2	Resultados experimentales obtenidos de la evaluación de la adecuabilidad del método cromatográfico	24

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Resultados experimentales de la curva de calibración de la <i>Z</i> -ligustílida (1) para evaluar la linealidad del sistema	27
Tabla 2	Resultados experimentales de la curva de calibración de la <i>Z</i> -ligustílida (1) para evaluar la linealidad del método y exactitud	29
Tabla 3	Resultados experimentales para evaluar la precisión (repetibilidad y precisión intermedia)	30
Tabla 4	Resultados de la evaluación de la estabilidad representados por $ d_i /(\%)$	31
Tabla 5	Cuantificación de la <i>Z</i> -ligustílida (1) y diligustílida (2) en diferentes muestras de droga cruda y preparados comerciales	32

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	<i>Ligusticum porteri</i> Coulter y Rose (Apiaceae). 1a) ejemplar de herbario; 1b) planta íntegra en su hábitat natural; 1c) raíces secas	2
Figura 2	Ejemplos de algunos productos herbolarios comerciales que contienen <i>L. porteri</i>	3
Figura 3	Distribución geográfica de <i>L. porteri</i> en México y Estados Unidos de Norteamérica (Trópicos de Missouri Botanical Garden)	3
Figura 4	Documentos oficiales referentes al control de calidad de plantas medicinales publicados por la OMS y sus países miembros	7

LISTA DE FIGURAS –continuación-

		Página
Figura 5	Equipo para la obtención de aceites esenciales por hidrodestilación directa	12
Figura 6	Cromatograma del extracto orgánico obtenido a partir de la muestra E de <i>L. porteri</i> por CLAE	14
Figura 7	Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>L. porteri</i>	19
Figura 8	Espectros de absorción al UV del extracto orgánico enriquecido de <i>L. porteri</i>	26
Figura 9	Gráfica de la evaluación de la linealidad del sistema de la Z-ligustílida (1)	28
Figura 10	Gráfica de la evaluación de la linealidad del método y exactitud de la Z-ligustílida (1)	30

I. ANTECEDENTES

1.1 Antecedentes de la especie *Ligusticum porteri* Coulter y Rose (Apiaceae)

1.1.1 Aspectos botánicos, químicos y farmacológicos de la especie *Ligusticum porteri*

Ligusticum porteri Coulter y Rose (Apiaceae), se utiliza sola o en combinación con otras plantas medicinales como *Croton niveus*, *Angelica archangelica*, *Juliana adstringens* y *Brickellia cavanillesii*, por mencionar algunas (**Figura 2**), para aliviar dolores de estómago y para tratar la tos, insomnio, resfriados, diarrea y otros desórdenes gastrointestinales. También se ha reportado su uso como agente antiséptico, carminativo, antidiabético y como antídoto contra la mordedura de alacrán (Appelt, 1985; Bye, 1986; Argueta *et al.*, 1994; Galaviz *et al.*, 1994; <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Esta hierba perenne se encuentra localizada principalmente en el sur de las Montañas Rocallosas desde el estado de Colorado hasta el sur de Arizona y en el norte de la Sierra Madre Occidental en los estados de Durango y Chihuahua (Mathías y Constance, 1944; Cronquist *et al.*, 1997, **Figura 3**). La especie es conocida por su nombre Tarahumara como “wasia” y popularmente con los nombres de “chuchupate”, “osha”, “raíz de angélica”, “raíz del cochino”, “yerba del cochino”, entre otros (**Figura 1a**) (Linares y Bye, 1987).

Esta especie presenta tallos firmes, caulescentes y ramificados que miden entre 50 y 100 cm de altura. Sus raíces son fibrosas, axonomórficas, perennes y presentan pocas raíces de tipo adventicio desde la corona. Las hojas son ovadas, pecioladas y trenado-pinnadas, miden entre 15 y 28 cm de largo y entre 12 y 20 cm de ancho, con lóbulos obtusos o agudos y dentados. Sus inflorescencias en forma de sombrilla son blancas. Sus frutos son esquizocárpicos y oblongos, entre 5 y 8 mm de largo y entre 2 y 4 mm de ancho. Sus semillas son aplanadas dorsalmente en la sección transversal y acanaladas bajo los tubos (Mathías y Constance, 1944; Cronquist *et al.*, 1997; Galaviz *et al.*, 1994) (**Figuras 1b y 1c**).



1b

1c

Figura 1. *Ligusticum porteri* Coulter y Rose (Apiaceae). **1a)** ejemplar de herbario; **1b)** planta íntegra en su hábitat natural; **1c)** raíces secas.



Figura 2. Ejemplos de algunos productos herbolarios comerciales que contienen *L. porteri*.

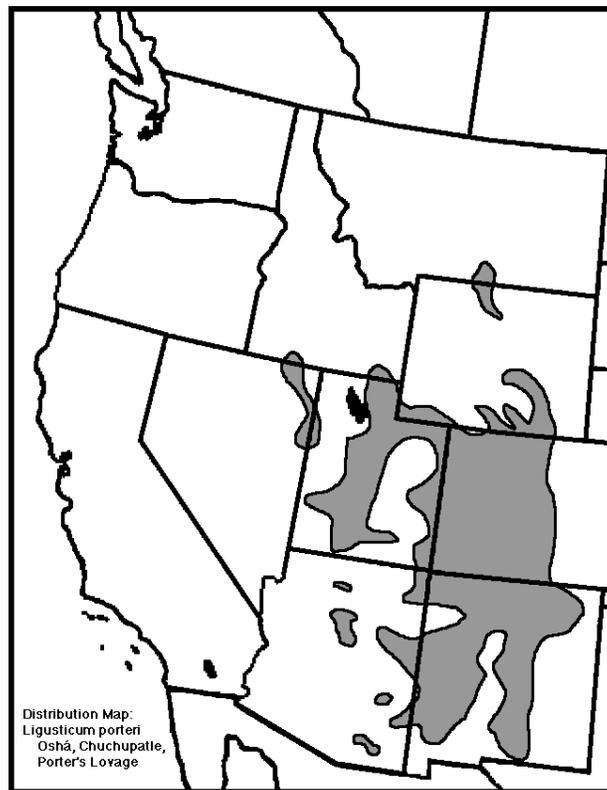
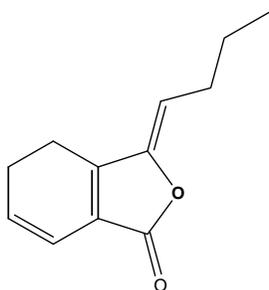


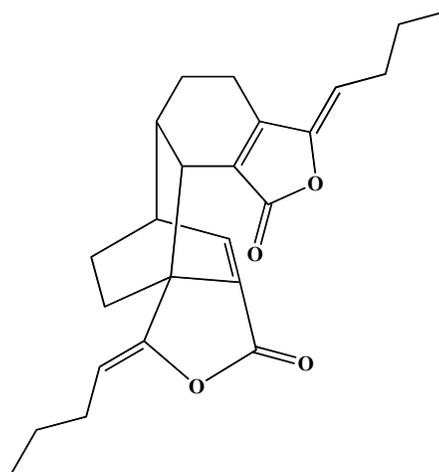
Figura 3. Distribución geográfica de *L. porteri* (Trópicos de Missouri Botanical Garden).

De acuerdo a la revisión bibliográfica efectuada durante el curso de la presente investigación, la especie *L. porteri* ha sido objeto de numerosas investigaciones desde el punto de vista químico. Los metabolitos aislados y caracterizados en estos estudios incluyen: ftálicas, terpenoides, compuestos fenólicos y cumarinas (Reza-Garduño, 1987; Delgado *et al.*, 1988, 1992; Ríos *et al.*, 1992; Zschocke *et al.*, 1998; Hernández-Vázquez, 1999; Hou *et al.*, 2004; Cégiela-Carlíoz *et al.*, 2005).

De estos metabolitos aislados las ftálicas *Z*-ligustílica (1) y diligustílica (2) han sido caracterizadas como los principios activos mayoritarios y responsables de las actividades neuroprotectoras, relajantes del músculo liso, antibacterianas, antidiabéticas y antisépticas del extracto íntegro de la planta (Kuang *et al.*, 2006; Chan, 2007).



Z-ligustílica (1)



diligustílica (2)

Desde el punto de vista farmacológico, la especie ha sido objeto de varias investigaciones. En el año 2007, se investigó la inocuidad del extracto íntegro, mediante la evaluación de su toxicidad aguda utilizando el método de Lorke (DL₅₀ 1085 mg/Kg) y genotoxicidad utilizando el ensayo de Ames (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

También se estableció el potencial antinociceptivo en ratones empleando la prueba del estiramiento abdominal. El efecto fue dependiente de la concentración y comparable al de la dipirona (100 mg/Kg) (Déciga-Campos *et al.*, 2005). Posteriormente se comprobó el efecto modulador de la resistencia multi-fármaco en *Staphylococcus aureus* de un extracto orgánico y

del aceite esencial de la planta, los cuales restauraron la sensibilidad de esta cepa al antibiótico norfloxacino (Cégiela-Carlio *et al.*, 2005).

Por último, Zuluaga-Quiceno (2009) evaluó el potencial antibacteriano de la especie contra la bacteria *Helicobacter pylori*. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto orgánico evaluado presenta una actividad anti-*H. pylori* significativa (CMI 31.25 µg/mL). En este mismo trabajo se demostró que la diligustílida (2), era uno de los principios activos contra *H. pylori*. El valor de CMI reportado fue de 5 µg/mL (Li *et al.*, 2005; Zuluaga-Quiceno, 2009).

1.2 El control de calidad de fitomedicamentos

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre al uso de las plantas medicinales y/o preparados herbolarios como una alternativa para el cuidado primario de la salud, esto debido a muchos factores entre los que destacan la falta de acceso a la medicina alopática, aspectos económicos y culturales, elevados costos de las terapias existentes para el tratamiento de enfermedades de tipo crónico y/o degenerativas (por ejemplo diabetes, cáncer, etc), entre otros.

Por otra parte, no obstante el amplio reconocimiento de los beneficios económicos y médicos de la medicina moderna, tanto en los países industrializados como en los países en vías de desarrollo, grandes sectores de la población dependen de los conocimientos de los curanderos sobre las plantas medicinales y preparados para aliviar sus enfermedades. De tal forma que la OMS estima que alrededor de 1,500 millones de seres humanos recurren a las terapias alternativas, reconociendo así el valor clínico de las plantas utilizadas. Esta última situación ha llevado al uso indiscriminado, poco racional, así como un comercio poco controlado y carente de regulación por parte de las autoridades sanitarias correspondientes (Bauer, 1998).

En este contexto, debido al creciente interés por el mercado de las plantas medicinales la OMS realizó un llamado a sus países miembros, para la realización de un inventario de los recursos herbolarios medicinales, además de elaborar documentos técnicos que contengan los criterios básicos relacionados con el control de calidad de las drogas crudas (pruebas de identidad, pureza y composición), descripción de los usos tradicionales, investigación farmacológica y clínica, posología, contraindicaciones y reacciones adversas potenciales, de las plantas medicinales ampliamente utilizadas en las prácticas médicas alternativas de cada país

(WHO, 1999; 2001). Con la finalidad de obtener el reconocimiento de la medicina tradicional como una parte integral de los sistemas nacionales de atención de la salud.

A pesar de los esfuerzos de la OMS, la medicina herbolaria ha evolucionado de manera diferente en las distintas regiones del mundo, siendo la medicina tradicional de la República Popular de China, una de las fuentes más valiosas y mejor documentadas, con más de 7,000 especies de plantas medicinales. Otra comunidad digna de mencionar es la Comunidad Europea, la cual ha dado un enfoque distinto al establecimiento de criterios armonizados para la evaluación de las fitomedicinas y con ello apoyar a la investigación científica y contribuir a la aceptación de la fitoterapia en el continente europeo. Por otro lado, en los Estados Unidos de Norteamérica también han avanzado de manera importante en el aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de los productos medicinales, al promover mediante una serie de textos científicos el uso responsable de estos medicamentos. Finalmente, México país con una enorme tradición en el uso de hierbas con fines curativos, no ha quedado exento de la influencia de todos los cambios ocurridos en el desarrollo y comercialización de los fitomedicamentos. Debido al interés del público por consumir estos productos cada uno de los países antes mencionados han publicado una serie de documentos de carácter oficial (**Figura 4**) que tratan de resumir los aspectos más relevantes de los métodos de análisis para determinar la identidad, pureza, composición y eficacia de las drogas crudas y sus preparados fitofarmacéuticos. En general, los parámetros utilizados para asegurar la calidad de las drogas crudas y/o preparados implican pruebas de identidad (botánica y química para el establecimiento de huellas digitales), pruebas de pureza (para identificar adulterantes y/o contaminantes) y pruebas de composición (que permitan establecer el contenido de principios activos y/o compuestos marcadores).

En este contexto, el estudio de los marcadores químicos en las plantas medicinales, resulta uno de los aspectos de mayor relevancia para evaluar la calidad de las drogas crudas y preparados herbolarios, al ser en muchos casos el único indicador que permite diferenciar a las drogas crudas de sus posibles sustitutos (Li *et al.*, 2008). Estos marcadores químicos se clasifican en ocho categorías que se enumeran a continuación:

a) Componentes terapéuticos, son los compuestos responsables de los efectos terapéuticos de un medicamento herbolario.

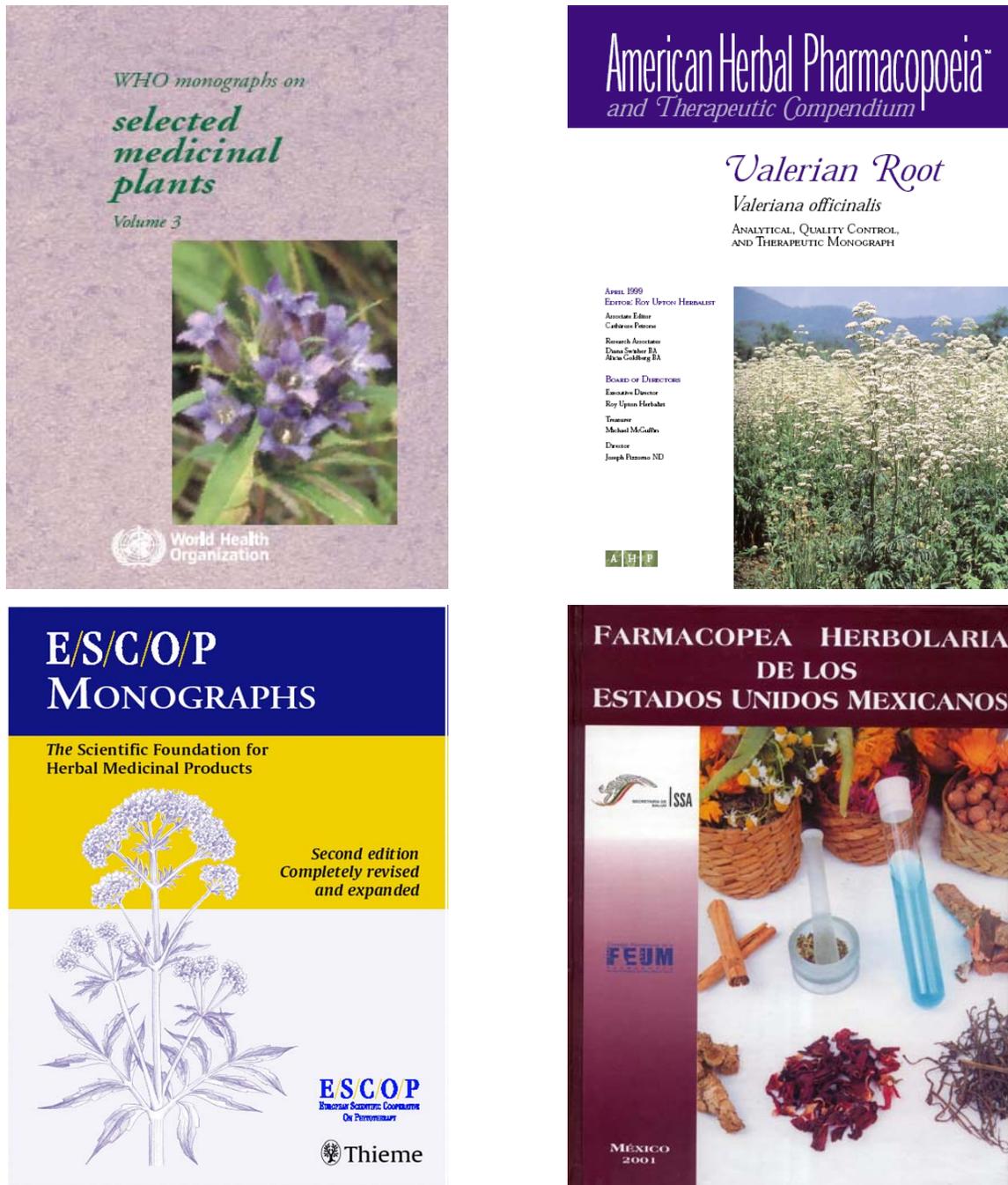


Figura 4. Documentos oficiales referentes al control de calidad de plantas medicinales publicados por la OMS y algunos de sus países miembros.

b) Componentes activos, los compuestos individuales que pueden o no presentar los efectos terapéuticos, sin embargo, en combinación contribuyen con los componentes terapéuticos en la actividad farmacológica.

c) Componentes sinérgicos, aquellos que no contribuyen a los efectos terapéuticos o actividad biológica directamente. Sin embargo, actúan como coadyuvantes de la actividad modulando los efectos terapéuticos.

d) Componentes característicos, aquellos compuestos específicos y/o restringidos que pueden o no presentar el efecto terapéutico.

e) Componentes mayoritarios, son los compuestos más abundantes presentes en un producto herbolario, pueden ser los componentes característicos y presentar alguna actividad biológica, además pueden usarse para análisis cualitativos, cuantitativos, identidad y evaluación de la estabilidad.

f) Componentes iniciadores, son los compuestos precursores o productos de una reacción química o enzimática. Son utilizados para evaluar la calidad y la estabilidad durante los períodos de almacenamiento largos.

g) Componentes tóxicos, compuestos responsables de la toxicidad o efectos adversos.

h) Componentes generales, son los componentes comunes y específicos presentes en una especie particular, género o familia.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Durante siglos, la medicina herbolaria tradicional y sus preparados han desempeñado un papel muy importante en los distintos sistemas de salud a nivel mundial en países como China, Estados Unidos de Norteamérica, México y Europa, como la fuente primaria para el tratamiento de diversas enfermedades, representando un importante recurso terapéutico. Sin embargo, a pesar del amplio uso de estas plantas medicinales son pocos los medicamentos herbolarios que han sido evaluados sistemáticamente para comprobar su seguridad, eficacia y calidad. La investigación científica necesaria para estos estudios es muy compleja, de carácter multidisciplinario, e involucra los análisis botánicos y etnomédicos, estudios toxicológicos, farmacológicos y químicos, procedimientos de control de calidad y de estandarización de las drogas crudas en función de su composición, como los aspectos más relevantes.

Con base en las consideraciones anteriores el presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial establecer una estrategia metodológica que permita la valoración de los principios activos y/o marcadores de la droga cruda y preparados fitofarmacéuticos derivados de la especie medicinal *Ligusticum porteri* Coulter y Rose (Apiaceae), la cual es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversos padecimientos entre los que destacan dolores de estómago, tos, insomnio, resfriados, diarreas y otros desórdenes gastrointestinales, por mencionar algunos. Se espera que los resultados derivados de esta investigación sirvan para integrar parte de la información científica relacionada con la composición de la especie medicinal *L. porteri*. La especie se seleccionó debido a que es una de las especies medicinales más comercializadas en el norte de México con fines curativos, sola o en combinación con otras drogas crudas y como productos herbolarios acabados.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Determinar la composición del aceite esencial obtenido por hidrodestilación a partir de la droga cruda de *L. porteri* mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM).
- 2.- Validar un método analítico por CLAE para cuantificar de manera simultánea el contenido de la Z-ligustílida (1) y diligustílida (2), principios activos mayoritarios responsables de las propiedades farmacológicas de la droga cruda.

III. PARTE EXPERIMENTAL

Pruebas de composición de la droga cruda de *Ligusticum porteri*

3.1 Material vegetal

Las muestras de corteza de la especie *Ligusticum porteri* Coulter y Rose (Apiaceae) utilizadas en el presente estudio, fueron adquiridas comercialmente en abril de 2009 en los mercados de Sonora (muestra A) y de la Lagunilla (muestra B), en la ciudad de México, así como, en los laboratorios Vita Nova (muestra C) y en el expendio del Prof. Alfonso Arámbula (muestra D), localizados en el estado de Chihuahua, México. Por otra parte, las muestras E y F fueron recolectadas en el municipio de Basigochi, Chihuahua, México en octubre de 2005. La muestra G fue recolectada en el municipio de Rabbit Ears Pass, Colorado, USA, en noviembre de 2005. La identificación y clasificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Las muestras de herbario [voucher: Bye 31733 (muestra E), Bye 33434 (muestra F) y Jennifer y Shawn Sigstedt 111703 (muestra G)] fueron depositadas en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM. De manera adicional, se adquirieron tres preparados herbolarios comerciales elaborados a partir de la droga cruda *L. porteri* (muestras H–J).

3.2 Procedimientos generales de análisis

3.2.1 Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 μm ASTM).

Los análisis cromatográficos por CCF analítica y de tipo preparativo (CCFP) se realizaron sobre placas de aluminio y de vidrio, respectivamente, de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 μm ASTM) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales y empleando diversos sistemas de elución (Cseke, 2006), como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110 °C durante un minuto.

La validación del método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar a la Z-ligustilida (**1**) y diligustilida (**2**) presentes en el extracto íntegro de *L. porteri*, se realizó utilizando el mismo método analítico previamente descrito por Zuluaga-Quiceno (2009), en un cromatógrafo de líquidos de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con un detector de UV Dual 2487. El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo marca Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas LECO Pegasus 4D. La columna utilizada fue del tipo 5% fenil-metil silicón HP, con una longitud de 30 m y 0.32 mm de diámetro. Se empleo helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la columna se programo de 150 a 300 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura del inyector y detector se ajustó a 275 °C. El voltaje para el registro de los espectros de masas utilizado fue de 70 eV. Las masas se registraron en un rango de 33 a 800 uma.

3.3 Preparación del aceite esencial de *L. porteri*

La preparación del aceite esencial a partir de 38.9 g del material vegetal seco y molido de la especie *L. porteri* se realizó mediante un proceso de hidrodestilación de acuerdo a las especificaciones de la Farmacopea Herbolaria de la Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2001) y la organización mundial de la salud (OMS) (WHO, 1998; **Figura 5**). Al cabo de este proceso, se obtuvieron 320 mg de un aceite amarillo.

3.4 Análisis de los componentes del aceite esencial de *L. porteri* (muestra C)

El análisis de la composición del aceite esencial obtenido a partir de la muestra C de *L. porteri*, se realizó por CG-EM. La identificación de los componentes mayoritarios presentes en la esencia se realizó mediante la comparación de los espectros de masas generados por los compuestos con aquellos de la biblioteca del equipo. Finalmente, la cuantificación de estos constituyentes se realizó mediante la medición de las correspondientes áreas bajo la curva de cada pico.

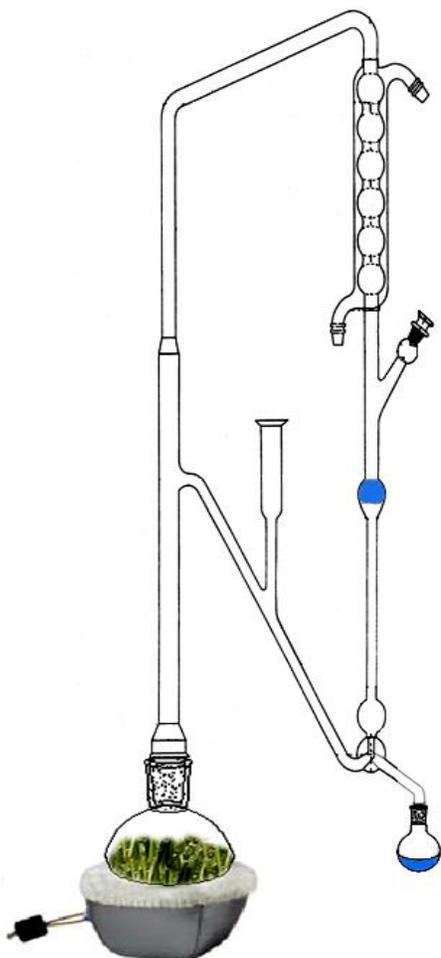
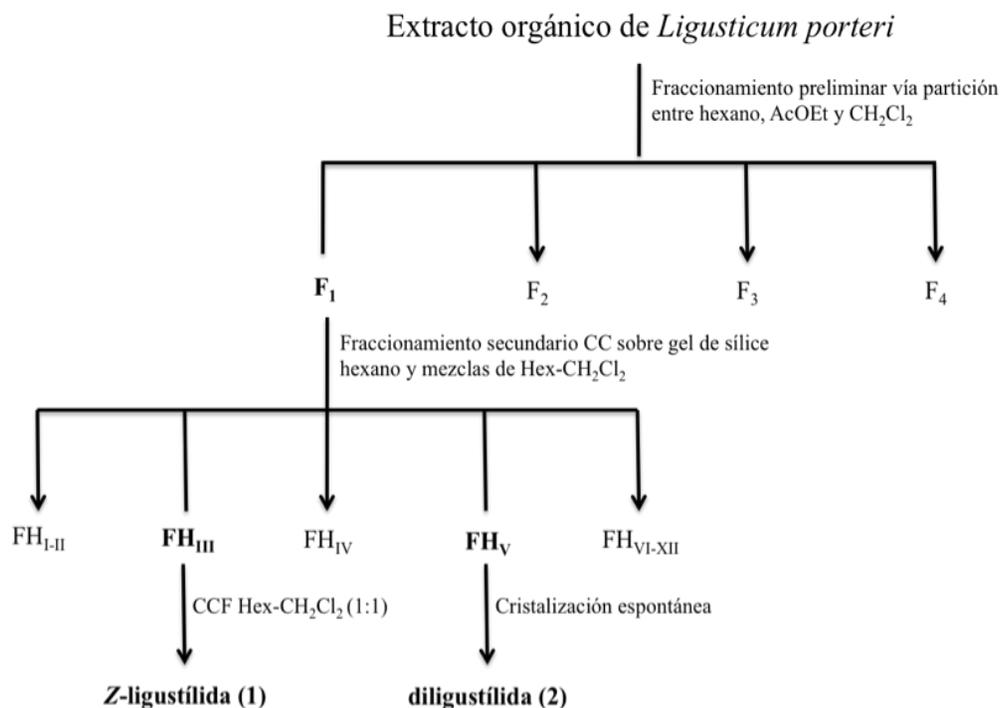


Figura 5. Equipo utilizado para la obtención de aceites esenciales por hidrodestilación directa FHEUM (2001).

3.5 Aislamiento de la *Z*-ligustílida (1) y diligustílida (2) a partir de la fracción de hexano primaria de *L. porteri*

El aislamiento por CC y CCFP de la *Z*-ligustílida (1) se realizó mediante un análisis cromatográfico sobre gel de sílice (1250 g) a partir de la fracción de hexano **F_I** (**Esquema 1**) utilizando como fase móvil hexano y mezclas de hexano-CH₂Cl₂ incrementando gradualmente la polaridad. Este procedimiento generó un conjunto de doce fracciones secundarias, **FH_I-FH_{XII}**. La resolución de la fracción secundaria **FH_{III}** mediante CCFP, utilizando como sistema de elución Hex-CH₂Cl₂ (1:1), permitió el aislamiento de un aceite amarillo identificado como la *Z*-ligustílida (1).

De la fracción primaria **FH_V** (**Esquema 1**), cristalizaron de manera espontánea 450 mg de un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 127-129 °C, idéntico en todos sus aspectos a la diligustílida (2).



Esquema 1. Aislamiento de la *Z*-ligustílida (1) y diligustílida (2) a partir del extracto orgánico de la corteza de *L. porteri*.

La presencia de la *Z*-ligustílida (1) y diligustílida (2) en *L. porteri* se corroboró mediante la co-inyección de una muestra de la matriz de trabajo y una solución estándar de 1 y 2. Observándose un incremento en el área del pico correspondiente a 1 ($t_R = 25$ min) y 2 ($t_R = 37.0$ min) (**Figura 6**).

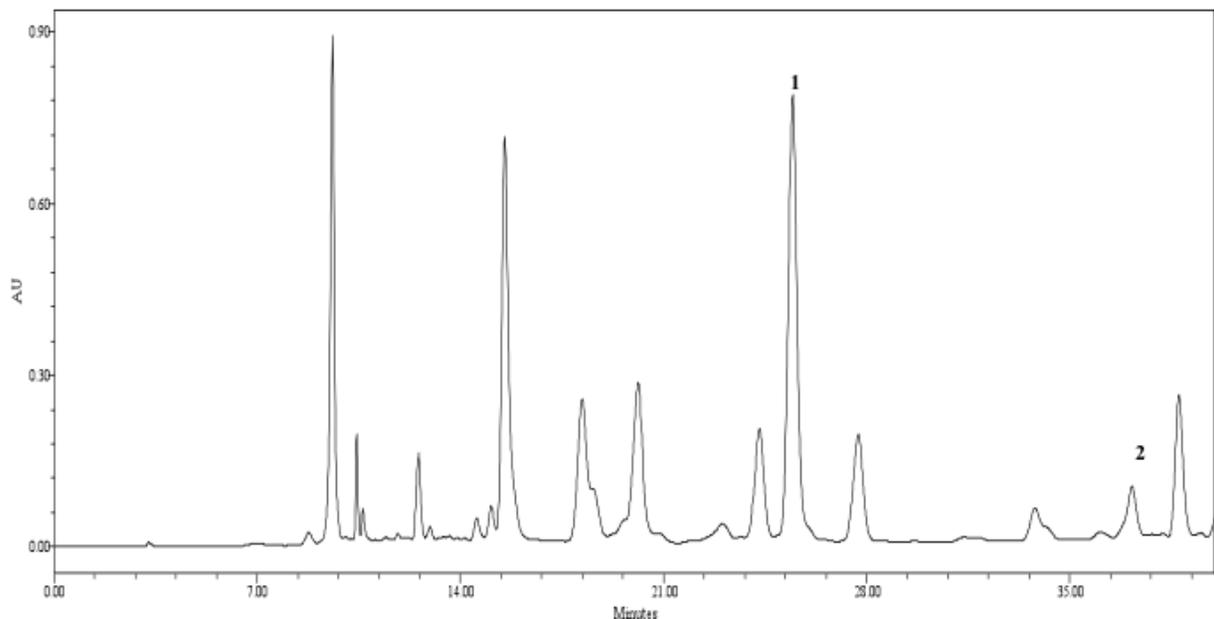


Figura 6. Cromatograma del extracto orgánico obtenido a partir de la muestra E de *L. porteri* por CLAE. Fase móvil: gradiente ACN-H₂O (0.5% AcOH) (2:8-1:0), velocidad de flujo: 1.0 mL/min. Fase estacionaria: columna Hibar® LiChrospher® 100 RP-18; **1** □□280 nm ($t_R = 25.0$ min) y **2** □260 nm ($t_R = 37.0$ min).

3.6 Determinación simultánea de la Z-ligustílida (**1**) y diligustílida (**2**) en la droga cruda de *L. porteri* por CLAE

Los análisis cromatográficos cuantitativos por CLAE se realizaron en una columna empacada con gel de sílice Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (Merck) con un tamaño de partícula de 5 μm , de 4.0 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud, equipada con un guarda columna compatible (Hibar® LichroCART® 4-4). Como sistema de elución, se utilizó un gradiente de ACN-H₂O (0.5% AcOH) [0-5 min: (20:80—53:47); 5-15 min: (53:47—53:47); 15-30 min: (53:47—70:30); 30-40 min: (70:30—100:0)]. La velocidad del flujo fue de 1.0 mL/min. La longitud de onda (λ) utilizada para la detección de **1** fue de 280 nm, y en el caso de **2** fue de 260 nm, las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Los tiempos de retención (t_R) de **1** y **2** bajo estas condiciones, fueron de 25 min y 37 min, respectivamente.

3.6.1 Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico

3.6.1.1 Preparación de la matriz de trabajo

El extracto íntegro (15 mg) de *L. porteri* preparado vía maceración con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) se disolvió en un mL de una mezcla binaria de CH₂Cl₂-ACN (2:8). La solución resultante se filtró a través de membranas de nylon Acrodisc® 0.45 µm y de 13 mm de diámetro y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos.

3.6.1.2 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema cromatográfico se determinó mediante el análisis de cinco réplicas de una solución de referencia con una concentración de 0.625 mg/mL. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se expresan en términos del coeficiente de variación (CV), factor de capacidad (K'), resolución (R), factor de coleo (T) y número de platos teóricos (N).

3.6.1.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la Z-ligustílida (1)

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de **1** se realizó mediante una serie de experimentos modificando las condiciones de almacenamiento del compuesto de referencia. Para este fin, el compuesto fue almacenado a temperatura ambiente, a -4 y 30 °C. En todos los casos se analizaron 20 µL de una solución con una concentración de 0.4 mg/mL por duplicado, a los siete días de almacenamiento. Los resultados se expresan en términos de diferencias absolutas de la media aritmética de cada condición de almacenamiento con respecto a la media aritmética del análisis inicial ($|d_i|$).

3.6.1.4 Selectividad

La evaluación de la selectividad del método se realizó mediante el registro de los espectros de UV de tres diferentes muestras, una correspondiente al compuesto **1**, la segunda a la matriz de trabajo y, la última, a la matriz de trabajo enriquecida con 0.65 mg/mL de **1**. Ésta última se preparó mezclando 50 µL de matriz de trabajo y 50 µL de la solución de referencia de **1** a una concentración de 1.3 mg/mL. Todas las muestras fueron filtradas a través de membranas de nylon Acrodisc® de 0.45 µm y de 13 mm de diámetro antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

3.6.1.5 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs absorbancia) de acuerdo al siguiente procedimiento: 2.5 mg de la referencia [Z-ligustilida (**1**)] se disolvieron en 1 mL de ACN (2.5 mg/mL). A partir de la solución anterior, se prepararon las disoluciones necesarias para que 1 mL de la misma contenga entre 0.0625 y 1.25 mg de la referencia a cuantificar. El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico de la referencia a cuantificar, se graficó con respecto a la concentración de la referencia en cada solución. El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $b_0=0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ y $IC(\beta_1)$ no incluye el cero. Las muestras se analizaron por triplicado.

3.6.1.6 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

La evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración con una serie de disoluciones a partir de una solución estándar con una concentración de 2.5 mg/mL y cinco muestras blanco. Las diluciones contenían 0.0625, 0.125 y 0.250 mg/mL de la referencia a cuantificar. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva del pico (ABC) correspondiente al pico de la referencia de cada réplica se graficó con respecto a la concentración de la referencia en cada solución. Para el cálculo de la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (b_1), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2), se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

3.6.1.7 Exactitud

La evaluación de la exactitud del método se realizó mediante la adición de tres diferentes concentraciones de **1** comprendidas en un rango entre 0.3125 y 1.25 mg/mL a la matriz de trabajo. Se evaluaron tres réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC. Estos valores se interpolaron en la curva de calibración desarrollada en el inciso

3.6.1.5. Los resultados obtenidos fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos ($b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $r \geq 0.99$, $r^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 3\%$) mediante un análisis de regresión lineal simple. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional [IC(β_1)] del % de recobro.

3.6.1.8 Precisión

La precisión del sistema o repetibilidad se estableció mediante el análisis de seis réplicas de una solución de referencia, la cual contenía 3 mg/mL de la matriz de trabajo enriquecida con una solución de la referencia con una concentración de 2.5 mg/mL. Por otra parte, la precisión del método o precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de seis réplicas a dos concentraciones diferentes de la referencia (0.625 y 1.25 mg/mL) adicionadas a la matriz de trabajo (3 mg/mL). El análisis se efectuó en dos días diferentes por dos analistas distintos.

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se analizaron mediante un ANADEVIA utilizando el estadístico de Fischer (F) y se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

3.7 Cuantificación de la Z-ligustílida (1) y diligustílida (2) presentes en las diferentes muestras de drogas crudas y preparados herbolarios de *L. porteri*

Veinticinco miligramos de la muestra a analizar disueltos en 2 mL de ACN se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc® de 0.45 μm y de 13 mm de diámetro. La Z-ligustílida (1) y diligustílida (2) presentes en cada muestra se cuantificaron registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones analíticas indicadas en el inciso 3.6, a partir del área bajo la curva (ABC) utilizando el software del equipo. En el caso del producto 2 la cantidad en miligramos de cada muestra se calculó por medio de la interpolación en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración previamente diseñada por Zuluaga-Quiceno (2009).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de contribuir al aseguramiento de la calidad de la droga cruda de la especie medicinal *Ligusticum porteri*, ampliamente comercializada en el norte del país sola o en combinación con otras plantas medicinales para tratar la tos, insomnio, resfriados, diarrea y otros desórdenes gastrointestinales, y como agente antiséptico, carminativo y antidiabético. El presente trabajo describe las pruebas de composición conducentes a establecer el contenido de los componentes mayoritarios y responsables de algunas de las actividades farmacológicas comprobadas de la especie. El análisis de la composición del extracto orgánico y de la esencia se efectuó mediante las técnicas de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). La cuantificación de las ftálicas mayoritarias presentes en la droga cruda se realizó mediante el desarrollo y la validación de un método analítico eficiente y adecuado, que permitió la cuantificación simultánea de dos de los principios biodinámicos, la *Z*-ligustílida (1) y la diligustílida (2). Ambos productos son los responsables de las actividades neuroprotectoras, relajantes del músculo liso y antibacterianas atribuidas a la droga cruda (Kuang, 2006; Chang, 2007; Déciga-Campos *et al.*, 2005).

Cabe destacar que la información científica generada será de utilidad para promover a nivel nacional el uso racional de la droga cruda y preparados herbolarios derivados de la especie y también servirá para la integración de la monografía tipo OMS de *L. porteri*.

4.1 Análisis del aceite esencial de *L. porteri* (muestra C) por CG-EM

El aceite esencial de *L. porteri* se obtuvo mediante un proceso de hidrodestilación directa como un líquido volátil de color amarillo. El análisis por CG-EM del aceite preparado a partir de la corteza permitió la identificación de 17 metabolitos secundarios, que constituyen el 85% del total de la esencia. La identificación de los compuestos α -felandreno, camfeno y 6-camfenol se realizó mediante la co-elución con muestras auténticas adquiridas comercialmente. La butilidenftálica se identificó por co-elución con la ftálica obtenida previamente del estudio químico del extracto íntegro. Así mismo, se realizó la comparación de los espectros de masas de los compuestos presentes en la esencia con aquellos de los compuestos de referencia incluidos en la biblioteca de datos del equipo. Los resultados de este análisis permitieron identificar a la butilidenftálica, 3-(1'-metilbutiliden)-4,5-dihidroftálica y 6-camfenol como los componentes

mayoritarios presentes en la esencia de *L. porteri* (**Cuadro 1**). En la **Figura 7** se muestra el cromatograma obtenido a partir del análisis de la muestra C.

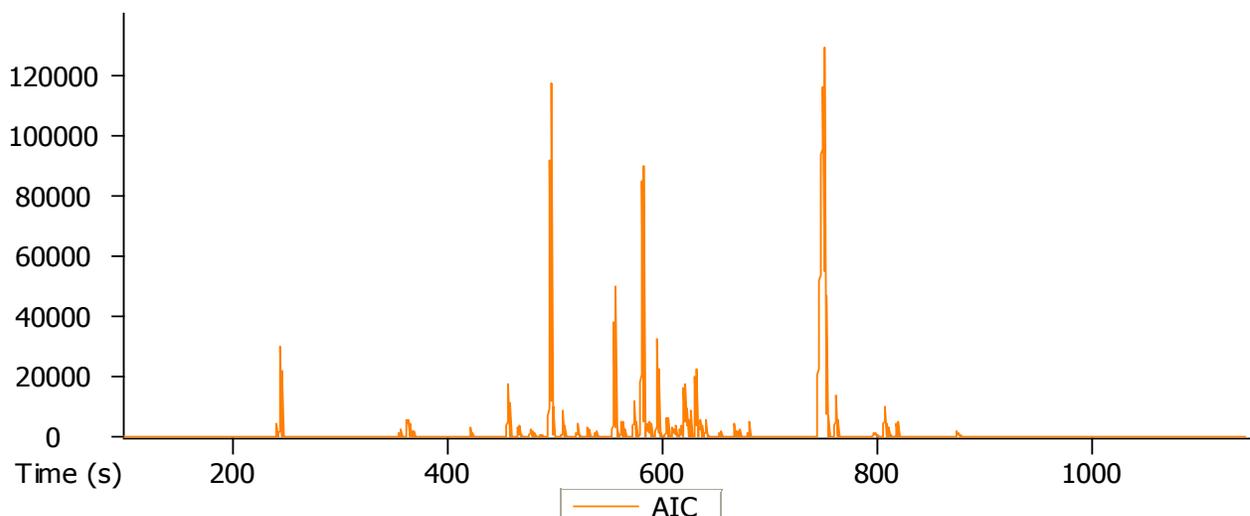
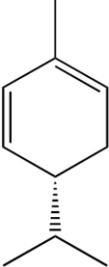
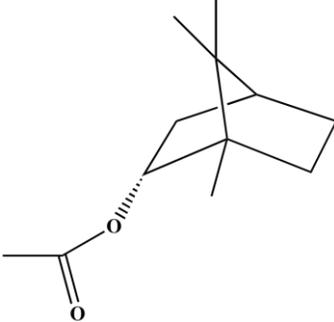
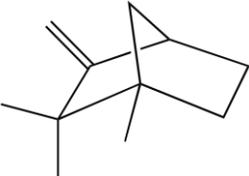
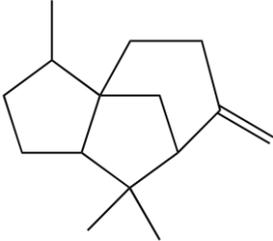


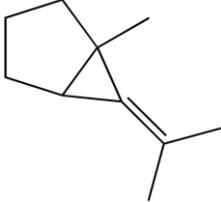
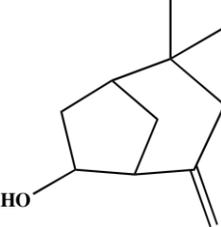
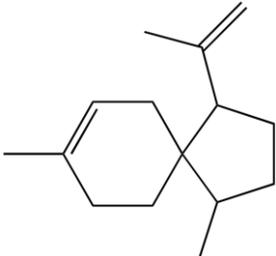
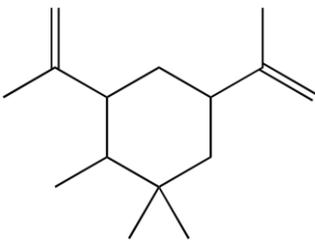
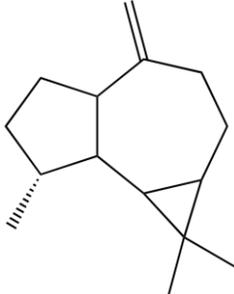
Figura 7. Cromatograma de gases del aceite esencial de *L. porteri*.

Estos resultados complementan a los reportados por Ríos y colaboradores (1992), que muestran que el análisis por CG-EM de una fracción de hexano de *L. porteri*, tiene como componentes mayoritarios a la butilidenoftálida (26.4%) y a los isómeros estructurales *Z* y *E* de la ligustílida (**1**) (28.0 y 28.3%, respectivamente). Otros componentes minoritarios presentes en la muestra analizada son el: α -pineno (1.7%), α -felandreno (2.3%), β -felandreno (2.9%), α -terpineno (3.0%), limoneno (2.4%) y *p*-cimeno (3.1%).

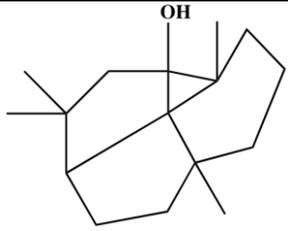
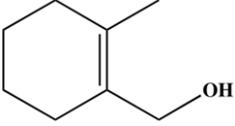
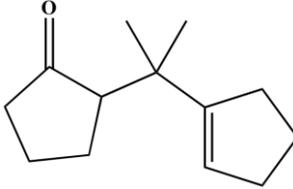
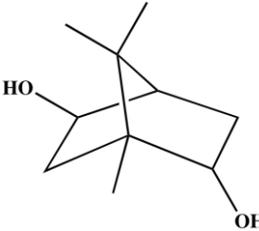
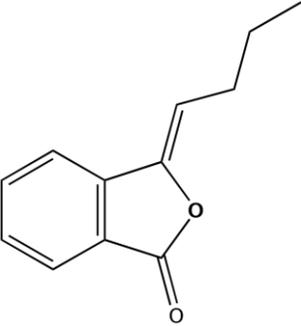
Cuadro 1. Compuestos identificados en el aceite esencial de *L. porteri* por CG.

t_R (seg)	Compuesto	Estructura	Composición (%)/ Fórmula molecular
245.25	α -felandreno		2.06/C ₁₀ H ₁₆
457.25	acetato de bornilo		1.33/C ₁₂ H ₂₀ O ₂
496.75	dehidrosabineno		3.91/C ₁₀ H ₁₄
507.95	camfeno		1.01/C ₁₀ H ₁₆
562.95	cedreno		1.18/C ₁₅ H ₂₄

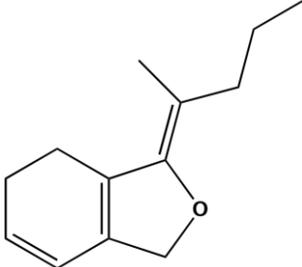
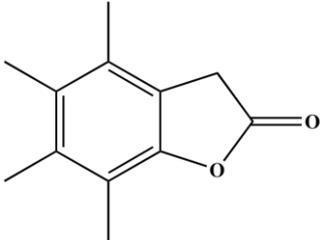
Cuadro 1. Compuestos identificados en el aceite esencial de *L. porteri* por CG (continuación).

t_R (seg)	Compuesto	Estructura	Composición (%)/ Fórmula molecular
574.35	6-isopropilideno-1-metil-biciclo- [3.1.0]-hexano		1.31/C ₁₀ H ₁₆
582.55	6-camfenol		15.73/ C₁₀H₁₆O
595.85	acoradieno		3.65/C ₁₅ H ₂₄
604.75	1,1,2-trimetil-3,5-bis(1- metiletenil)-ciclohexano		1.82/C ₁₅ H ₂₄
620.65	aromadendreno		1.12/C ₁₅ H ₂₄

Cuadro 1. Compuestos identificados en el aceite esencial de *L. porteri* por CG (continuación).

t_R (seg)	Compuesto	Estructura	Composición (%)/ Fórmula molecular
621.15	ginsenol		2.20/C ₁₅ H ₂₆ O
631.55	1-hidroximetil-2-metil-1-ciclohexeno		1.45/C ₈ H ₁₄ O
635.65	2-(1-ciclopent-1-enil-1-metiletil)-ciclopentanona		1.00/C ₁₃ H ₂₀ O
640.55	2,5-diol-1,7,7-trimetil-biciclo-[2.2.1]-heptano		0.77/C ₁₀ H ₁₈ O ₂
751.65	butilidenftálida		24.71/C₁₂H₁₂O₂

Cuadro 1. Compuestos identificados en el aceite esencial de *L. porteri* por CG (continuación).

t_R (seg)	Compuesto	Estructura	Composición (%)/ Fórmula molecular
797.05	3-(1'-metilbutiliden)-4,5-dihidroftálida		16.47/C ₁₃ H ₁₈ O
798.75	4,5,6,7-tetrametil-ftálida		4.87/C ₁₂ H ₁₄ O ₂

4.2 Ensayos de composición para cuantificar a la *Z*-ligustílida (**1**) y diligustílida (**2**) presentes en *L. porteri* por CLAE

Para la valoración simultánea de la *Z*-ligustílida (**1**) y diligustílida (**2**), se seleccionó el método analítico por CLAE, previamente desarrollado por Zuluaga-Quiceno (2009). Es importante destacar que la validación de un método de análisis conducente a establecer el contenido de los principios biodinámicos **1** y **2** presentes en *L. porteri* resulta fundamental no sólo para asegurar la calidad de la droga cruda, sino también para la elaboración de preparados estandarizados considerando la importancia en el mercado de esta planta medicinal.

Una vez seleccionado el método de análisis, se procedió a ajustar experimentalmente la concentración de la matriz de trabajo para obtener una respuesta analítica (área bajo la curva) del detector en un rango menor a 0.1 unidades de absorbancia. Enseguida se ajustaron las señales correspondientes a las sustancias de interés **1** y **2** y se identificaron por co-elución con muestras de referencia. Los resultados derivados de este análisis permitieron establecer una concentración para la solución de referencia de la matriz de trabajo de 15 mg/mL y para el compuesto **1** de 2.5 mg/mL.

Enseguida, se realizó la evaluación de la adecuabilidad del método cromatográfico siguiendo los lineamientos establecidos por la FEUM, con la finalidad de establecer si el sistema de medición establecido es adecuado y la respuesta analítica detectada es independiente de las condiciones ambientales, realizando para ello, una serie de inyecciones en el cromatógrafo de una solución de referencia de **1** con una concentración de 0.625 mg/mL, de acuerdo al protocolo experimental. Los resultados obtenidos y cálculos realizados se resumen en el **Cuadro 2** y nos permiten estimar los siguientes parámetros: coeficiente de variación (CV), factor de capacidad (K'), resolución (R), factor de coleo (T) y número de platos teóricos (N). Estos resultados nos permiten establecer que la columna evaluada separa de manera adecuada al analito de interés y que la respuesta analítica observada es apropiada para cuantificar el contenido de **1** (FEUM, 2007).

Cuadro 2. Resultados experimentales obtenidos de la evaluación de la adecuabilidad del método cromatográfico.

Parámetro	Valor calculado	Especificación
Coeficiente de variación (CV)	0.6	< 2
Media aritmética (\bar{y})	18391595	
Desviación estándar (S)	110704.854	
Factor de capacidad (K')	6.8125	2 < K' < 10
Resolución (R)	1.6	> 2
Factor de coleo (T)	1.5	< 2
Número de platos teóricos (N)	1111	

Finalmente, se desarrolló el procedimiento de validación del método analítico para cuantificar al principio mayoritario **1**, y así poder completar parte de la información científica necesaria para establecer la composición y poder cuantificar de manera simultánea a los principios biodinámicos **1** y **2** presentes tanto en la droga cruda sola y en combinación con otras hierbas en productos herbolarios comerciales. Los parámetros de calidad evaluados de acuerdo a las normas internacionales establecidas por la International Committee of Harmonization (ICH) y

Eurachem incluyen: linealidad del método y sistema, precisión, exactitud y especificidad (ICHQ2R1, 2005 y documentos ahí citados).

4.2.1 Validación del método

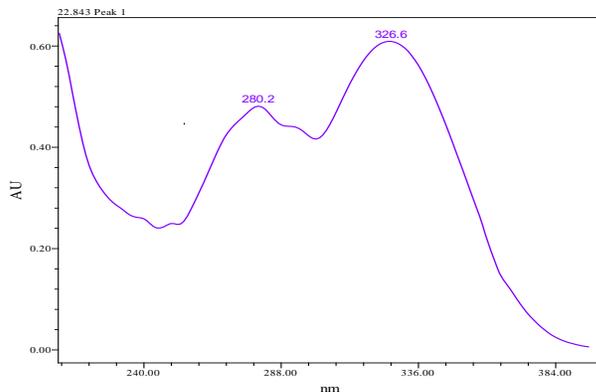
4.2.1.1 Selectividad

La selectividad se evaluó comparando los espectros de absorción obtenidos al UV (210-400 nm) de tres muestras correspondientes al compuesto de referencia **1** (1.3 mg/mL), a la matriz de trabajo (1.5 mg/mL) y a la matriz de trabajo enriquecida con el compuesto **1** (0.65 mg/mL). Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 8** y como se puede observar, la adición de 0.65 mg/mL del analito de interés a una muestra que contenía 3 mg/mL de la matriz de trabajo, produjo un incremento en la respuesta analítica sin modificar los máximos de absorción. Estos resultados nos indican que la respuesta analítica observada se debe únicamente a la presencia de **1**.

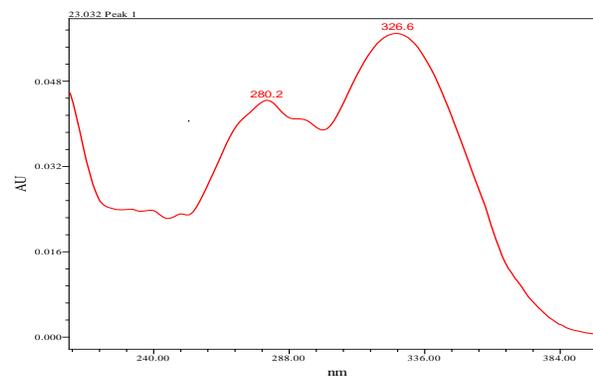
4.2.1.2 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración con cinco diferentes niveles de concentración en un rango de concentraciones entre 0.0625 a 1.25 mg/mL. El compuesto utilizado como referencia durante el desarrollo del método analítico fue aislado previamente de la especie *L. porteri* y tiene una pureza del 98%, de acuerdo a los análisis cromatográficos realizados. Los resultados de las curvas de calibración se resumen en el **Tabla 1** y en la **Figura 9**. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del sistema a partir de este análisis fueron: pendiente de la recta (b_1 : 2.8×10^7), ordenada al origen (b_0 : 3.4×10^5), coeficiente de correlación (r : **0.996**), coeficiente de determinación (r^2 : **0.992**) e intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$: $2.7 \times 10^7 - 2.8 \times 10^7$) con $t_{(0.975,28)} = 2.048$. Finalmente, para evaluar si la ecuación obtenida describe adecuadamente la relación entre las dos variables (concentración vs respuesta analítica) se realizó un análisis de varianza de la regresión lineal (ANADEVA). Estos resultados indicaron que el parámetro **F** (estadístico de Fisher), calculado para la regresión, supera a su valor crítico ($F_{(0.05,1,4)} = 3609.11$), por lo tanto, la variación en la respuesta se encuentra explicada por el modelo propuesto. Posteriormente, la prueba de hipótesis

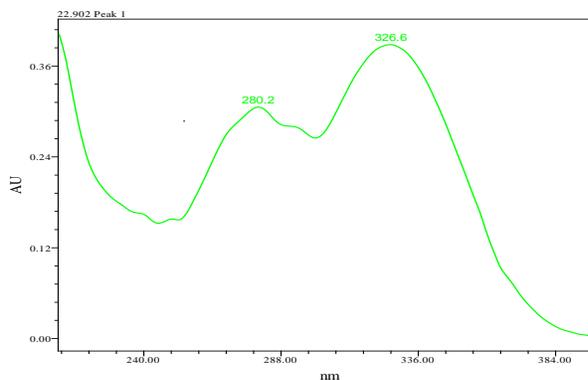
relativa a los coeficientes de regresión demostraron que la pendiente de la recta de la regresión obtenida es diferente a cero y la ordenada al origen tiene el valor de 3.4×10^5 (1). En conjunto estos resultados nos permiten evidenciar que el método analítico es lineal en el rango de concentraciones ensayadas.



a) solución de referencia



b) matriz de trabajo



c) matriz de trabajo enriquecida con la solución de referencia

Figura 8. Espectros de absorción al UV del extracto orgánico enriquecido de *L. porteri*. Detector: PDA 996. Fase móvil: gradiente ACN-H₂O (0.5% AcOH); velocidad de flujo: 1.0 mL/min; fase estacionaria: columna LiChrospher® 100 RP-18.

Tabla 1. Resultados experimentales de la curva de calibración de la Z-ligustólida (**1**) para evaluar la linealidad del sistema.

Réplica	Concentración (mg/mL)	ABC
1	1.25	33827497
2	1.25	32563190
3	1.25	32657311
4	1.25	38295517
5	1.25	34926394
6	1.25	36843676
1	0.5	14193443
2	0.5	12830663
3	0.5	15550020
4	0.5	15043809
5	0.5	14600735
6	0.5	15335809
1	0.25	6953527
2	0.25	7011204
3	0.25	7027065
4	0.25	7115105
5	0.25	7007524
6	0.25	7303818
1	0.125	3692142
2	0.125	3682572
3	0.125	3655579
4	0.125	3901984
5	0.125	3953202
6	0.125	4004015
1	0.0625	2111810
2	0.0625	1948005
3	0.0625	1839701
4	0.0625	1798354
5	0.0625	2069667
6	0.0625	2060604

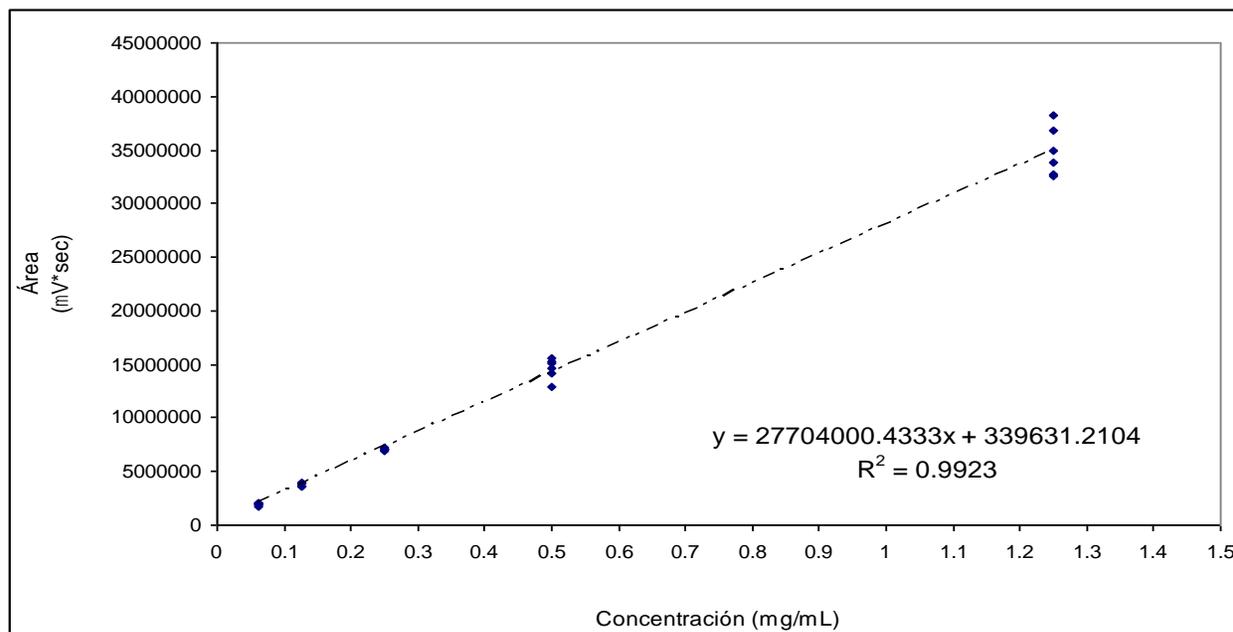


Figura 9. Gráfica de la evaluación de la linealidad del sistema de la Z-ligustílica (1).

4.2.1.3 Linealidad del método y exactitud

Estos parámetros de calidad se evaluaron utilizando la curva de calibración construida a partir de disoluciones de la matriz de trabajo enriquecidas con una muestra de referencia que contenían tres diferentes niveles de concentración del compuesto **1**. Las cantidades de la referencia que se adicionaron a la matriz fueron 0.3125, 0.625 y 1.25 mg/mL de **1**, que representan el 50, 100 y 150% del analito, respectivamente (**Tabla 2** y **Figura 10**).

De nueva cuenta, el ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del sistema a partir de este análisis fueron: b_1 : **1.008**; b_0 : **-0.0036**; r : **0.999**; r^2 : **0.999**; $IC(\beta_0)$: **-0.014 - 0.007**; $IC(\beta_1)$: **0.995 - 1.021** con $t_{0.975,28} = 2.048$ y coeficiente de variación de la regresión $CV_{y/x}$: **1.3** %.

De estos resultados se infiere que el método analítico es lineal. La exactitud del método se determinó mediante los porcentajes de recobro indicados en la **Tabla 2**, estos resultados indican que el promedio del porcentaje de recobro se encuentra dentro del rango establecido (98-102%) y el intervalo calculado fue de **98-101%**. Por lo tanto, el método analítico es exacto.

Tabla 2. Resultados experimentales de la curva de calibración de la Z-ligustólida (**1**) para evaluar la linealidad del método y la exactitud.

Solución	Cantidad adicionada (mg/mL)	Área ($\mu\text{V*s}$)	Cantidad recuperada (mg/mL)	% Recobro
1	1.25	35352278	1.2638	101.1
2	1.25	34740859	1.2417	99.3
3	1.25	35489964	1.2688	101.5
4	1.25	35511148	1.2695	101.6
5	1.25	34467195	1.2319	98.5
6	1.25	35058682	1.2532	100.3
1	0.625	18011006.5	0.6379	102.1
2	0.625	17974399.5	0.6365	101.8
3	0.625	17744750	0.6283	100.5
4	0.625	17853214	0.6322	101.1
5	0.625	17643989.5	0.6246	99.9
6	0.625	17674741	0.6257	100.1
1	0.3125	8875502.5	0.3081	98.6
2	0.3125	8840785.5	0.3069	98.2
3	0.3125	8938814.5	0.3104	99.3
4	0.3125	8948908.5	0.3108	99.4
5	0.3125	8832771.5	0.3066	98.1
6	0.3125	8864636.5	0.3077	98.5

4.2.1.4 Precisión del método y del sistema

La precisión como una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de análisis, se evaluó a través de la respuesta analítica de seis soluciones con una concentración del analito de 0.625 y/o 1.25 mg/mL. Este análisis se realizó por duplicado en un solo día por un solo analista (repetibilidad) y en diferentes días por dos analistas diferentes (precisión intermedia). De acuerdo a los resultados indicados en la **Tabla 3**, los valores de CV calculados para la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia fueron de **0.7** y **1.2** %, respectivamente (criterios de aceptación: $\text{CV} \leq 1.5\%$ y 2.0% , respectivamente), con lo que se concluye que el método analítico es preciso.

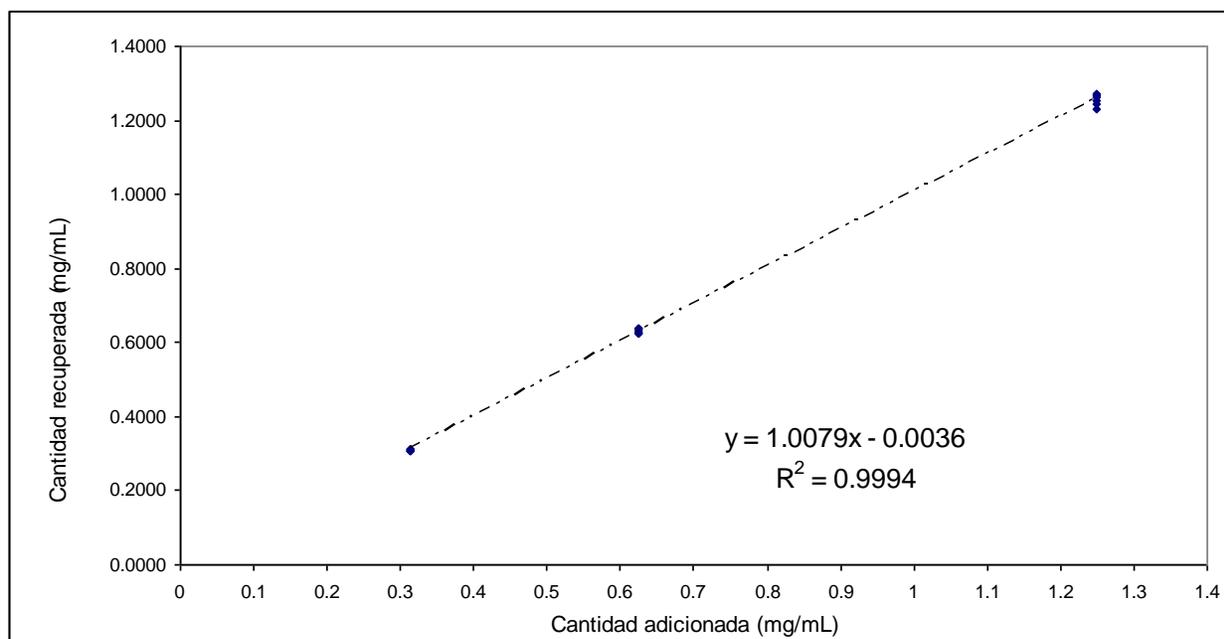


Figura 10. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método y exactitud de la Z-ligustílida (1).

Tabla 3. Resultados experimentales para evaluar la precisión (repetibilidad/precisión intermedia).

Solución	Concentración (mg/mL)	Día 1		Día 2/analista 1	Día 3/analista 2
		Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Concentración (mg/mL)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	1.25	37099270.5	0.625	17509324	17339501.5
2	1.25	36804548.5	0.625	17403368	17426030.5
3	1.25	36647689.5	0.625	17744750	17483743.5
4	1.25	37024051.5	0.625	17853214	17643989.5
5	1.25	37225346.5	0.625	18042939	17844513.5
6	1.25	37362067.5	0.625	17674741	17810018.5
Promedio		37027162.3	Promedio	17704722.7	17591299.5
Desv. estándar		264652.3	Desv. estándar	231489.233	208334.316
CV		0.71	CV	1.24	

4.2.1.5 Límites de detección y de cuantificación

La evaluación de la concentración mínima de un analito en la muestra que puede ser detectada (límite de detección, LD) y la concentración mínima de analito que puede ser detectada y cuantificada (límite de cuantificación, LC) con una precisión y exactitud aceptables, se determinó a partir de una curva de calibración con tres niveles de concentración comprendidas entre un rango de 0.0625 y 0.25 mg/mL. Así, realizando el análisis estadístico de los datos y utilizando las expresiones matemáticas indicadas en el inciso 3.6.1.6 de la sección experimental, los valores de LD y LC calculados fueron **0.03** y **0.09** mg/mL, respectivamente.

4.2.1.6 Estabilidad

Los estudios de estabilidad realizados en la presente investigación para establecer la posible variación de la concentración de una muestra con respecto al tiempo y bajo la influencia de la temperatura y diferentes condiciones de almacenamiento (NOM-073-SSA1-2005), nos permitieron establecer que con excepción de las muestras a temperatura de refrigeración (-4 °C), todas las muestras de análisis a 37 °C y temperatura ambiente, son inestables al presentar descomposición o degradación química del analito de interés. Estos resultados se resumen en la **Tabla 4** y son expresados como la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje, respecto de la media aritmética del análisis inicial ($|d_i|$). Una muestra se considera estable cuando el valor de $|d_i| \leq 2\%$.

Tabla 4. Resultados de la evaluación de estabilidad representados por $|d_i|$ (%).

	$ d_i /(\%)$		
	7 días		
Z-ligustílida (1)	-4°C	37°C	Temperatura Ambiente
	1.2/19.6	3.1 /88.9	11.9/82.4

4.2.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios 1 y 2 presentes en los extractos orgánicos de *L. porteri*

Una vez validado el método analítico se procedió a cuantificar de manera simultánea el contenido de Z-ligustílida (1) y diligustílida (2) en siete extractos de *L. porteri* (muestras A-G) y en tres preparados herbolarios comerciales designados con las claves Lp₁-Lp₃ (muestras H-J).

Para cuantificar el analito **2** en cada una de las muestras se utilizó la misma ecuación de la recta previamente reportada por Zuluaga-Quiceno (2009) y que se indica a continuación: $y = 6.8 \times 10^7 x + 4.7 \times 10^5$

Los resultados de este análisis se resumen en la **Tabla 5**. Como se desprende de estos resultados, con excepción de la muestra H, en todas las muestras analizadas se encuentra presente la Z-ligustílida (**1**) como el componente mayoritario, encontrándose que las muestras A-E son las que contienen la mayor cantidad del compuesto marcador. En todos los casos la concentración del compuesto **2** es mucho menor. Así, con base en estos resultados podemos concluir que existe una gran variabilidad en el contenido de ambos compuestos marcadores en cada una de las muestras de *L. porteri* analizadas.

Cabe destacar que la presencia del analito **1** como componente mayoritario se debe a la mayor estabilidad de este metabolito con respecto al dímero analizado, el cual se puede romper fácilmente para generar a los monómeros correspondientes.

Tabla 5. Cuantificación de la Z-ligustílida (**1**) y diligustílida (**2**) en diferentes muestras de droga cruda y preparados comerciales.

	Muestra	1 (mg/100g)	2 (mg/100g)
A	Mercado de Sonora	2.30	0.25
B	Mercado de la Lagunilla	2.49	1.04
C	Lab. Vita Nova	2.54	0.35
D	Prof. Alfonso Arámbula	2.03	0.32
E	Basigochi, Chihuahua	2.26	0.26
F	Basigochi, Chihuahua	1.91	0.31
G	Colorado, EE.UU	0.52	0.04
H	Lp ₁ cápsulas	No presente	No presente
I	Lp ₂ cápsulas	0.16	0.047
J	Lp ₃ Linimento	0.91	0.02
K	Infusión muestra F	0.47	0.02
L	Infusión muestra G	0.072	No presente

V. CONCLUSIONES

a) El presente trabajo de investigación constituye una aportación original al aseguramiento de la calidad de las drogas crudas y remedios herbolarios de amplio uso en la medicina tradicional de México, y en particular a la composición de la especie *Ligusticum porteri*.

b) El análisis del aceite esencial obtenido por hidrodestilación, a partir de la corteza de la planta, mediante la aplicación de la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, permitió identificar a la butilidenftálida (24.71%) y 3-(1'-metilbutiliden)-4,5-dihidroftálida (16.47%), compuestos con propiedades antibacterianas demostradas, como los constituyentes mayoritarios. Otros componentes caracterizados en la esencia son la 4,5,6,7-tetrametil-ftálida (4.87%), el camfeno (1.01%) y el 6-camfenol (15.73%).

c) La validación del método analítico desarrollado por CLAE para cuantificar de manera simultánea el contenido de los componentes mayoritarios y responsables de algunas actividades farmacológicas Z-ligustíflida (**1**) y diligustíflida (**2**), del extracto orgánico de *L. porteri*, fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas. Por otra parte, el desarrollo de este método analítico será de utilidad para el desarrollo de las pruebas de composición tanto de la droga cruda como de los preparados herbolarios fabricados con la planta.

d) La cuantificación de los principios activos **1** y **2**, a partir de las diferentes muestras y preparados herbolarios analizados, permitió evidenciar al compuesto **1** como el componente mayoritario, así como la ausencia de uno o ambos, en algunos preparados comerciales y/o droga cruda; dicha variabilidad puede deberse a factores ambientales como son el tiempo y sitio de recolecta, así como a los procesos de secado de la droga cruda.

e) Finalmente, la información científica generada a través de la presente investigación aporta parte del conocimiento requerido para integrar una monografía tipo OMS y contribuir al uso racional de la especie *L. porteri*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 325-348.
- ❖ Appelt, G.D. (1985). Pharmacological aspects of selected herbs employed in hispanic folk medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: I. *Ligusticum porteri* (Osha) and *Matricaria chamomilla* (Manzanilla). *Journal of Ethnopharmacology*, 13, 51-55.
- ❖ Argueta, V.A., Cano, A.L. y Rodarte, M.E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México. p 759.
- ❖ Bauer, R. (1998). Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standars be achieved? *Drug Information Journal*, 32, 101-110.
- ❖ Bye, R.A. (1986). Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic botany*, 40, 103-124.
- ❖ Cégiela-Carlioz, P., Bessiere, J.M., David, B., Mariotte, A.M., Gibbons, S. y Dijoux-Franca, M.G. (2005). Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Journal of Flavour and Fragrance*, 20, 671-675.
- ❖ Chan, S.K., Cheng, T.Y. y Lin, G. (2007). Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 677-680.
- ❖ Cronquist, A., Holmgren, N.H. y Holmgren, P.K. (1997). Intermountain flora. Vascular plants of the intermountain west, USA. Vol. 3 Part A. Subclass Rosidae (except Fabales). The New York Botanical Garden Bronx, New York. USA. p 340-341, 365-367.
- ❖ Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J. y Brielmann, H. (2006). Natural Products from Plants. 2da edición. Editorial Taylor & Francis, New York, USA.
- ❖ Déciga-Campos, M., González-Trujano, E., Navarrete, A. y Mata, R. (2005). Antinociceptive effect of selected Mexican traditional medicinal species. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 48, 70-72.

-
- ❖ Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G.E., Navarrete, A. y Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 334-342.
 - ❖ Delgado, G., Reza-Garduño, R.G., Toscano, R.A., Bye, R.A y Linares, E. (1988). Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-Ray structure of Z-6,6',7,3a'-diligustilide. *Heterocycles*, 27, 1305-1312.
 - ❖ Delgado, G., Reza-Garduño, R.G., Ríos, M.Y. y Del Río, F. (1992). Phtalides y monoterpenes of the hexane extract of the roots of *Ligusticum porteri*. *Planta medica*, 58, 570-571.
 - ❖ Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2000). 7ª edición. Secretaria de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México.
 - ❖ Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2001). Secretaria de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, México.
 - ❖ Galaviz, A., Galaviz, C., Galaviz, L. y Duarte, C. (1994). Flora medicinal Pima de Yecora, Sonora. Flora medicinal indígena de México: treinta y cinco monografías del atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I. Instituto Nacional Indigenista. México, p 90-105.
 - ❖ Hernández-Vazquez, L. (1999). Reactividad química de toquinolida B, una ftálide dimérica aislada de *Ligusticum porteri*. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM.
 - ❖ Hou, Y.Z., Zhao, G.R., Yang, J., Yuan, Y.J, Zhu, G.G. y Hiltunen, R. (2004). Protective effect of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Life Sciences*, 75, 1775–1786.
 - ❖ <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
 - ❖ Kuang, X., Yao, Y., Du, J.R., Liu, Y.X., Wang, C.Y. y Quian, Z.M. (2006). Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Research*, 1102, 145-153.
 - ❖ Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J.Y. y Tan, R.X. (2005). In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 329-333.

-
- ❖ Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C.L., y Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*, 3, 1-16.
 - ❖ Linares, E. y Bye, R.A. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 153-183.
 - ❖ Mathias, M.E. y Constance, L. (1944). Umbelliferae. *North American Flora*, 28B, 143-148.
 - ❖ NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-073-SSA-2005. Estabilidad de medicamentos. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. Disponible en la página electrónica de la Secretaría de Salud: <http://bibliotecas.salud.gob.mx>.
 - ❖ Reza-Garduño, R.G. (1987). Aislamiento y caracterización de los ftálicos de *Ligusticum porteri* C & R (Umbelliferae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
 - ❖ The European Medicines Agency. (2008). Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. (<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/hmpc/25362907en.pdf>).
 - ❖ World Health Organization-Tradición Medicina. (1998). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. WHO, Geneva, Switzerland, 1-5.
 - ❖ World Health Organization-Tradición Medicina. (1999). WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. I. WHO, Geneva, Switzerland.
 - ❖ World Health Organization-Tradición Medicina. (2001). WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. II. WHO, Geneva, Switzerland.
 - ❖ Zschoke, S., Liu, J.H., Stuppner, H. y Bauer, R. (1998). Comparative study of roots of *Angelica sinensis* and related Umbelliferous drugs by Thin Layer Chromatography, High-Performance Liquid Chromatography, and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 9, 283-290.
 - ❖ Zuluaga-Quiceno, M.J. (2009). Pruebas de composición, identidad y eficacia selectas de utilidad para el aseguramiento de la calidad de la droga cruda de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae). Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.